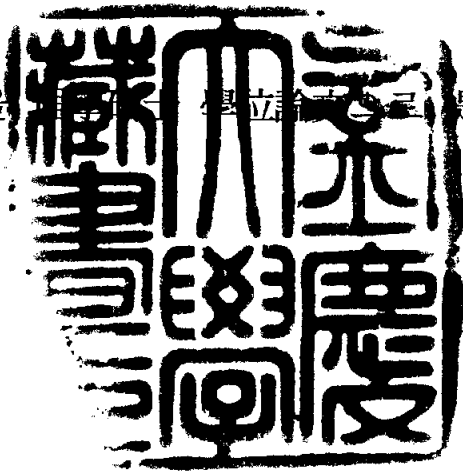


이학석사 학위논문

Vancomycin Resistant *Enterococcus*의
내성률 조사 및 PCR을 이용한 형별분류

지도교수 송 영 환

이 論文을 韓 立 大 學 校 로 呈 出 함



2002년 8월

부경대학교 산업대학원

산업미생물학과

김 종 숙

이 논문을 김종숙의 이학석사 학위논문으로 인준함

2002년 7월 일

주 심 이학박사 김 영 태



위 원 이학박사 김 진 상



위 원 이학박사 송 영 환



목 차

Abstract

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 균주	5
2. 균주의 동정	5
3. 항균제 감수성 검사	8
4. VRE phenotype 판정	11
6. 세균 염색체 DNA 분리	13
7. DNA sequencing	14
III. 결 과	15
1. Vancomycin resistant <i>Enterococcus</i> 의 분리동정	15
2. 항균제 감수성 검사	18
3. VRE phenotyping	21
4. PCR을 이용한 VRE 유전자형 형별 분류	23
5. <i>vanA</i> 유전자의 염기서열 분석	24
IV. 고 찰	29
V. 요 약	35
VI. 참고 문헌	36

* 감사의 글

Analysis of Resistance Rate and PCR-based genotyping of VRE

Jong-Sook Kim

*Department of Industrial Microbiology
Graduate School of Industry
Pukyong National University*

Abstract

On the basis of the identification and MIC test, 25 strains of vancomycin resistant *enterococcus* (VRE) resumed were isolated from 25 patients at P. University Hospital in Busan. Among them, 9 strains were identified as *E. faecium*, 11 *E. faecalis*, 2 *E. gallinarum*, 1 *E. durans*, and 2 *E. spp* Phenotyping by vancomycin and teicoplanin test showed that three strains have VanC type, 1 VanD, and others VanA type. The genotyping by the PCR technique using *vanA* and *vanB* specific primer sets was performed against 8 of *E. faecium*. The results revealed that the DNA fragment (1030 bp) was amplified from 8 strains, confirming that phenotyping is similar to genotyping.

I. 서 론

Vancomycin에 내성을 나타내는 장구균 (vancomycin-resistant *enterococci*, VRE)은 중요한 원내 감염균으로서 인식되고 있으며¹⁾, 1986년 유럽에서 최초로 발견되었고 이후 1988년 프랑스에서 보고된 후²⁾ 그 분리 빈도가 급속한 증가를 나타내고 있으며 1989년 미국 CDC의 보고에 따르면³⁾ VRE에 의한 패혈증과 심내막염의 감염률이 매우 빠르게 증가하고 있다고 알려져 있다.

장구균 (*Enterococcus*)은 통성혐기성 그람양성 구균이다. 병독성이 약한 병원균으로 위장관과 여성 생식기에 상주하다가 각종 기회 감염증을 유발하기도 하며 대부분의 장구균 감염증은 개개 환자가 가지고 있는 균에 의해 내인성 감염증이 된다. 문제가 되는 VRE에 의한 감염증은, 정상인에게는 쉽게 감염을 유발하지 않지만, 만성질환자 또는 병원에 입원 중인 환자 특히 암, 복막부 외과 수술 후의 환자 및 백혈병, 화상, 이식 등의 환자에게는 가끔 패혈증 및 복막염등 중요한 감염증을 일으켜 사망을 일으키기도 한다. 또한 요로 감염증, 패혈증, 심내막염, 중증 기저질환, 면역부전의 환자에서 중증 감염을 일으킬 수 있다⁴⁾.

한편 백 등의 보고에 의하면⁵⁾ VRE에 의한 장구균 감염증의 유행 원인이 직원의 손 및 오염되어진 의료 기구 또는 환경의 표면을 매개로 환자와의 직접적 또는 간접적 접촉에 의한 미생물의 전이에 의한 것임이 밝혀지면서 중요한 원내 감염균으로 부각되고 있다⁶⁾. 국내에서는 1992년 박 등⁷⁾이 백혈병 환자의 가검물로부터 vancomycin에 고도 내성을 보이는 균주 (*Enterococcus durans*)를 보고한 이래 국내에서 몇 차례 보고가 산발적으로 이루어지고 있다.

VRE는 두 가지 형태로 존재한다⁸⁾. 첫째는, 내성 전이에 의한 것이 아니라 본래 균 자체 내성 (intrinsic resistance)을 보이는 것으로 *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*와 *E. flavescens*가 이런 특징을 나타내고 있다. 다른 한 종류는 획득내성 (acquired resistance)을 보이는 것인데 다른 organism으로부터 vancomycin 내성 유전정보를 획득하는 것을 말하며 *E. faecium*과 *E. faecalis*에서 주로 나타나고 그 외에 *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans*와 다른 enterococcal species에서도 발견되고 있다.

VRE의 특징적 유전자로는 *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*와 *vanG* 등을 포함하며, 이들 유전자들은 D-Ala-D-Ala ligase와는 다른 아미노산을 결합시키는 ligase를 만들게 된다. Glycopeptide인 vancomycin, teicoplanin 등의 항생제는 세균의 세포벽 합성에 필수적인 peptidoglycan 전구체의 N-terminal 말단부의 D-Ala-D-Ala와 결합하여서 peptidoglycan 중합에 필요한 transglycosylation을 저해함으로써 항균작용을 나타낸다. VRE는 *van* 계열의 유전자에 의해 새로이 만들어진 ligase를 이용하여 세포벽 성분이 vancomycin과 결합하여 저해하지 못하는 다른 아미노산을 세포벽 성분으로 합성함으로써 vancomycin에 대해 저해 받지 않고 살아가게 된다. 지금까지 분자생물학적 연구에 의하면, 이러한 vancomycin 내성에 관여하는 유전자는 ligase를 만드는 *vanA* 계열 주위에 유전자 발현조절에 관여하는 유전자 *vanR*과 *vanS*, 또 다른 ligase인 *vanH*, *in vitro*에서 기존의 peptidoglycan을 분해하는 *vanX*와 *vanY*, 그리고 기능이 아직 밝혀지지 않은 *vanZ* 유전자들과 cluster를 형성하고 있다. *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA* 그리고 *vanX* 유전자들은 vancomycin 내성에 필수적이거나, *vanY*와 *vanZ* 유전자들은 내성에 필수적이지 않다. *vanB* 유전자 역시 *vanA*의 cluster에서 나타나는 유사

한 유전자들로 cluster를 형성하고 있다⁹⁾.

*E. faecalis*와 *E. faecium*이 병원에서 분리되고 있는 주요 VRE 균으로 일반적으로 vancomycin ($>128 \mu\text{g/ml}$)과 teicoplanin ($>16 \mu\text{g/ml}$)에 높은 MIC (minimum inhibitory concentration) 값을 나타내고 있다¹⁰⁾. 이들은 주로 *vanA* 유전자를 가지고 있어 *vanB* 유전자를 가지고 있는 것들은 vancomycin에 대해 비교적 낮은 내성 (MIC $16-64 \mu\text{g/ml}$)을 보이며 teicoplanin (MIC $< 1 \mu\text{g/ml}$)에 대해 내성을 나타내지 않고 있다. 최근 *vanD* 유전자를 가진 *E. faecium*이 보고되었는데, 이들은 vancomycin (MIC $64-128 \mu\text{g/ml}$), teicoplanin (MIC $4-8 \mu\text{g/ml}$)에 비교적 낮은 내성을 보인다. *E. gallinarum*과 *E. casseliflavus*와 *E. flavescens* 등은 근본 내성을 나타내며 *vanC* 유전자를 일반적으로 가지며 vancomycin에 대해 $2-16 \mu\text{g/ml}$ 의 MIC 값을 보이고 있다. 따라서 species level에서 VRE에 대한 동정이 VanC (자체 내성)인지 VanA나 VanB (획득 내성)인지를 확인하는데 도움이 되기 때문에 감염에 대한 조절 과정에 필수적이라고 할 수 있다. *vanA*나 *vanB* 유전자는 균과 균 사이에서 전이가 될 수 있기 때문에 균과 균 사이에 전이가 일어나지 않는 *vanC* 유전자와는 달리 급성 질병 발생의 원인이 될 수 있다.

발병 환자는 VRE를 가지고 있으며, 질병의 여러 현상을 목격할 수 있다. 하지만, 일시적으로 VRE를 보유한 사람은 표면상 그 질병의 증상이 나타나지 않는다. 따라서, VRE를 screening할 때 이점은 중요한 차이를 나타낸다. VRE 집락균 수는 발병 환자나 보유 환자의 변에 비슷한 숫자를 나타내기 때문에 발병 환자만을 대상으로 조사한다면, 그 병원은 병원 시설 내 잠재된 전염성을 간과하는 것이 된다.

본 실험은 부산시내 P 종합병원에 입원한 환자의 임상 검체에서 분리

된 VRE를 대상으로 균주에 대한 동정 및 VRE phenotype 검정, PCR을 이용한 유전자형 확인을 실시하여 그 양상을 파악함으로써 환자의 격리 및 치료에 효과가 되고 원내 감염의 기회를 감소시키는데 활용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주

본 실험에서는 1999년 11월부터 2001년 12월까지 부산 소재 P 대학 병원 25명의 환자에서 분리된 VRE 25 균주를 사용하였다. 25명의 환자 중 남자는 11명이고 여자 14명이며 이 환자들 중 11명이 신경외과 중환자실 입원환자들이었고 10명이 내과 환자이고 그 외 일반외과 1명, 재활의학과 1명, 비뇨기과 1명, 응급실 1명 등이었다. 입원환자 및 외래환자의 임상검체에서 분리 동정된 VRE를 대상으로 시행하였다. PCR검사, 항생제 감수성 검사 및 다른 일련의 생화학 검사를 위하여 다음과 같은 표준균주를 대조균주로 사용하였다. 표준균주로는 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (희석법용은 ATCC 29213 사용), *E. coli* ATCC 25922 및 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 사용하였다. *E. faecalis* A256 (*vanA* 유전자), *E. faecalis* V583 (*vanB* 유전자) 및 *E. gallinarum* VR-42 (*vanC-1* 유전자)는 유전자 은행에서 분양받아 사용하였다.

2. 균주의 동정

1) Manual 방법

제 1차 간이 감별법으로 각 검체를 Blood Agar plate (BAP), Bile esculin azide agar plate, Enterococcosel agar (BBL)에 접종하여 35℃에서 24시간 배양한 후 BAP상에서는 α -hemolysis, non-hemolysis를

나타내고 Enterococcosel agar (BBL)에서는 작은 검은 색을 띄는 균을 선택하여 이를 TSB 또는 normal saline에 균을 푼 다음 Gram staining 하여 diplo 및 chain 형태를 확인한 후 catalase test, 6.5% NaCl 시험을 실시하였다. 보다 정확한 확인 동정을 위한 제 2차 시험으로는 arginine dihydrolase, arabinose, raffinose 및 lactose에서의 산생성, 운동성 및 색소생성능, MGP 시험을 실시하였으며, 아래와 같은 실험을 실시하였다.

① BEAA (Bile esculin azide agar) 분해능

40% 담즙이 든 BE 배지에서 증식되고 esculin의 가수분해능을 본다. 평판법과 시험관법이 있는데 시험관법을 따랐다. Bile esculin azide agar (BEAA)는 장구균의 선택배지이다. BE 한천에는 소의 담즙 분말인 oxgall (Difco) 4% 들어 있어서 D군 이외의 연쇄구균을 억제하며, BEAA에는 oxgall은 1%가 든 대신에 sodium azide가 0.015%가 들어 있어서 그람음성 간균이 억제된다. 이 BEAA agar (Difco)를 사용하여 만든 배지를 사용했으며 양성 대조균주로는 *E. faecalis* ATCC 29212를, 음성 대조균주로는 *Streptococcus agalactiae*를 사용하였다.

집락 1개를 백금으로 따서 BEAA slant agar에 streaking 한 다음 35℃에서 24시간 배양하여 검은색을 확인한다. 이때 어떤 *E. spp*는 느리게 반응을 하는 경우가 있으므로 반드시 균이 충분히 발려졌는지 확인하였다.

② SF 분해능

SF배지에는 sodium azide가 선택제로 들어 있고 장구균이 증식되면 포도당을 발효하여 지시약이 노란색으로 변한다. 본 연구에서는 6.5%

NaCl 내성시험 대신에 SF 한천평판을 BEAA와 함께 사용했다. 즉, SF 한천은 SF broth에 dextrose의 최종농도가 1% 되도록 추가하고, 한천을 1.5% 넣은 평판배지를 BEAA와 함께 장구균의 감별에 쓴다. 따라서 균을 잘 picking하여 배지에 streaking 한 다음 35℃ 24시간 배양 후 노란색을 띄었는지 확인하였다.

③ Tellulite 분해능

Tryptose blood agar base등 영양이 충분한 고체 배지를 121℃에서 15분간 멸균하고 50℃로 식힌다. 여과 멸균한 potassium tellurite를 최종 농도가 0.04% 정도 넣고 평판을 만든다. 시험 세균을 접종하고 35℃에 배양한다. 검은색 집락이 생기면 양성이다. *E. faecalis*는 대개 2일 이내에 양성을 보였다.

2) Kit를 사용한 동정

① API 32 STERP Kit (bioMerieux, USA)를 이용하였다.

멸균된 Distilled Water에 균을 풀어 API 32 STERP Kit에 주사기로 균을 분주한 다음 37℃에서 24시간 반응시킨 다음 Reading 기계를 이용하여 reading하였다.

② BBL CRYSTSL™

BBL CRYSTAL™ 전용 broth로 균액을 McFarland 0.5로 맞춘 다음 이 균액을 용액조의 주입구에 전액 붓고 panel을 거꾸로 35℃에서 18-24시간 배양 후 BBL CRYSTAL Panel Viewer에서 결과 판독 후 Computer Cord Book에서 균명 검색하였다.

3) 자동화 기기 방법

① Vitek GPI card (bioMerieux Vitek Inc, Hazelwood, Mo., U.S.A.)

35℃에서 24시간 배양한 집락 3-5개를 백금으로 채취하여 0.45% NaCl에 잘 푼 다음 vortex mixer에서 잘 진탕하고 Vitek Colorimeter (Vitek Special DR 100 Colorimeter)에서 McFarland No. 0.5에 맞춘 다음 상품화된 Vitek GPI card에 넣어 반응한 다음 Vitek에 내장된 data base에 의해 결과가 도출된다. 각 *E. spp*의 정확한 동정을 위하여 반드시 manual과 병행한 다음 결과를 도출했다.

② Microscan (WalkAway 96, Baxter)

균액 접종 후 panel을 기기에 장착 후 결과를 출력했다.

3. 항균제 감수성 검사

1) Disk diffusion method

① 시험조건: Mueller-Hinton agar

이 방법은 Kirby-Bauer법 (National Committee for Clinical Laboratory Standards 법)의 변법에 의한다. 잘 자란 집락 4-5개를 백금으로 채취하여 4-5 ml의 TSB (Tryptic soy broth, BBL)에 접종한다. 윗게 혼탁될 때까지 35℃에서 2-5시간 배양한 다음, 식염수나 TSB로 희석하여 McFarland No. 0.5로 맞춘 다음 균 부유액 10 μ l를 M-H 배지 (Difco)에 도말한 다음 disk를 놓은 다음 35℃에서 16-18시간 배양한 후에 결과 판독은 억제대의 지름을 caliper나 자를 써서 mm 단위로 재거나 동심은 template를 사용했다. 디스크의 정도관리 및 정확성을 위해 매회

검사마다 *E. faecalis* ATCC 29212의 감수성 시험을 동시에 실시하였다. 투과광선으로 관찰하여야 하며 억제대 내에 균주의 성장이 약간이라도 있으면 내성을 뜻한다. 디스크법과 MIC법을 동시에 실시하였다. 감수성 여부 판독을 위한 MIC breakpoint는 2002 NCCLS의 기준을 사용하였다.

② 사용 항균제

A) A Primary test and report

penicillin or ampicillin

B) B Primary test report selectively

vancomycin

C) C Supplemental report selectively

gentamicin (고도내성 시험)

streptomycin (고도내성 시험)

D) U Supplemental for urine only

ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, nitrofurantoin,
tetracycline

항균제는 ampicillin (10 μ l), ciprofloxacin (5 μ l), vancomycin (30 μ l), tetracycline (30 μ l)을 BBLTM (Becton Dickinson Co. USA)에서 구입하여 사용하였다. 항균제 사용 방법은 다음과 같은 방법에 따라 시행하였다.

세균	배지	접종방법	배양	
			시간	가스환경
FDA 승인				
Enterococcus	MHA	DCS/SPG	16-18	공기
Staphylococcus	MHA	DCS	16-18 oxacillin은 24시간	공기
Enterobacteriaceae	MHA	DCS/SPG	16-18	공기

Isenberg HD (Ed) (1992) Clin. Microbiol. pro. handbook. Washington DC: American Society for Microbiology.

2) β -lactamase 계열 항균제 screen test

β -lactamase 생성에 의하여 ampicillin 또는 penicillin에 내성인 enterococci는 통상적인 디스크 확산법 및 희석법에 신뢰성 있게 검출이 안되며, 따라서 혈액 및 뇌척수액에서 분리된 세균의 경우 nitrocefin 디스크를 이용한 직접적인 β -lactamase 시험이 요구된다. β -lactamase 시험 양성은 penicillin, acylamino-penicillin, carboxy-penicillin 및 ureido-penicillin에 내성임을 뜻한다. 여러 가지 방법이 소개되고 있지만 상품화된 디스크 법을 사용하였다. Nitrocefin 디스크 법은 nitrocefin이 들어 있는 종이 디스크에 물을 추기고 시험세균을 문지른다. 노란색이 분홍으로 변하면 양성이다. 대개 5분 이내에 반응이 나타나지만 S. aureus는 1시간이 걸릴 때도 있었다.

3) MIC TEST

① E-test

AB Biodisk (Solna, Sweden)를 구입하여 사용하였다.



② 자동화기기 방법

Vitek GPS card (bioMerieux Vitek Inc, Hazelwood, Mo., U.S.A.)를 이용하였다. 35℃에서 24시간 배양한 집락 3-5개를 백금으로 채취하여 0.45% NaCl에 잘 푼 다음 vortex mixer에서 잘 진탕하고 colorimeter에서 McFaland 0.5에 맞춘 다음 다른 0.45% NaCl tube에 200 μ l를 pipette으로 넣고 잘 혼합하여 card에 주입시켜 reading하였다.

4. VRE phenotype 판정

1) NCCLS disk법 (간이추정)

Vancomycin과 teicoplanin disk를 이용하여 disk-diffusion method로 phenotype을 간이 추정하였다. 각 phenotype의 판정은 다음 표에 따랐다.

	Vancomycin	Teicoplanin
VanA	저지대가 거의 형성 안된 경우	저지대가 거의 형성 안된 경우
VanB	Va주위에 약 10 mm이하의 저지대가 형성, 또는 저지대가 거의 형성 안된 경우	명료한 저지대형성
VanC	디스크 주위에 명료한 저지대가 형성되고 Va 디스크 주위에 저지대가 특정에서 판정보류의 경우가 있다.	Va 감수성의 장구균은 disk 주위에 명료하고 큰 저지대가 형성되고 측정에 의해 감수성이라고 판정한다.

5. PCR을 이용한 VRE 유전자형 형별 분류

PCR 반응은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, U.S.A.)를 사용하여 수행하였다. *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*에 대한 유전자 서열을 분석하기 위하여 각각의 유전자를 증폭시키는 다양한 specific primer가 사용된 것으로 보고되었다¹¹⁻²⁰⁾. 본 연구에서는 *vanA*와 *vanB* 유전자를 구분하기 위한 아래와 같은 specific primer를 제작 의뢰하여 사용하였다.

vanA S primer, 5'-CATGAATAGAATAAAAAGT

vanA AS primer, 5'-CCCCTTTAACGCTAATAC

vanB S primer, 5'-GTGACAAACCGGAGGCGAGGA

vanB AS primer, 5'-CCGCCATCCTCCTGGAAAAA

PCR을 위한 반응액은 primer 10 pmol, dNTPs 200 μ M, MgCl₂ 2 mM, Ampli Taq Polymerase 2.5 units, bacterial DNA 10 ng의 반응 혼합물을 이용하였고, 멸균 증류수로 최종 부피 50 μ l로 하여 사용하였다.

PCR 반응조건은 94℃에서 1분간 denaturation, 53℃에서 1분간 primers 의 annealing, 72℃에서 1분간 extension, 이러한 반응을 1회로 하여 30 회 실시하였다. PCR products는 1.5% agarose gel 전기영동 후, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator 상에서 band를 확인하였다.

6. 세균 염색체 DNA 분리

염색체 DNA 분리는 바이오니아 AccuPrep genomic DNA extraction kit를 사용하여 bacterial DNA 추출에 맞게 그 manual을 변형하여 사용하였다. 각 실험 균주를 TSB broth 1 ml에 접종하여 35℃에서 16시간 배양하여 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리한 후 TE buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 3회 세척하였다. 세척한 균주를 TE buffer 200 μl 에 현탁하였다. 현탁액에 lysozyme (30 mg/ml)을 10 μl 첨가하여 37℃에서 2시간 반응시킨 후, proteinase K (10 mg/ml)를 20 μl 첨가하여 56℃에서 반응액이 맑아질 때까지 반응시켰다. 여기에 200 μl 의 Binding buffer를 넣고 잘 섞은 다음 60℃에서 10분간 반응시켰다. 여기에 100 μl 의 Isopropanol을 넣고 5초간 가볍게 vortex하여 섞고 2 ml collection tube에 들어있는 binding column에 옮겨 담고 8000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 500 μl 의 washing buffer 1과 500 μl 의 washing buffer 2로 washing 한 다음, 200 μl 의 elution buffer로 genomic DNA를 확보하였다. PCR template로 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

7. DNA sequencing

PCR 산물을 전기영동한 후 바이오니아의 gel purification kit를 이용하여 manual에 따라 elution하였다. elution한 PCR 산물을 증폭하는데 사용된 specific primer의 한 쪽을 이용하여 양쪽에서 각각 direct sequencing을 하였다. Perkin-Elmer의 ABI310 automatic sequencer를 사용하였으며, Big-Dye terminator 방법을 사용하여 PCR하였다.

Ⅲ. 결 과

1. Vancomycin resistant *Enterococcus*의 분리동정

본 실험에 사용된 균주는 1999년 11월부터 2001년 12월까지 부산 소재 P 대학 병원에서 25명의 환자들로부터 VRE로 의심되는 균주를 분리하였다. 우선 이들 분리된 균주에 대한 동정을 실시하였다. *Enterococcus* spp의 1차 간이감별법으로 Enterococcosel agar (BBL) 배지에 접종하여 검은 colony를 형성하는 것을 확인하였다. 이때, 검은 colony는 다 *Enterococcus*가 아니며 3개의 검체에서 확인한 바 *Lactobacillus*로 판명되었으며, gram 양성 간균이므로 gram 염색상에서 구분이 되며 *Lactobacillus*는 catalase 음성, motility 음성이므로 장구균으로 오인될 소지가 다분하며, 3개의 검체가 분변 검체이었음으로 장구균만을 선택적으로 분리할 수 있는 배지가 절실히 필요할 것으로 사료된다. vancomycin 내성 장구균은 gram staining상에서는 그람양성 구균, 단독, 쌍 또는 짧은 사슬 모양으로 배열된 것을 확인했으며 catalase test 음성, 6.5% NaCl test 양성, motility test에서는 양성 또는 음성, arginine dihydrolase, 당 test를 실시한 바 각 *E. spp*의 전형적인 생화학적 특성을 나타내었다.

분리된 균주들에 대한 동정에서 *E. spp*에 대한 기준은 Table 1에 나타내었다. 25 균주 모두 자동동정분석기인 Vitek, Microscane, Crystal-BBL 및 동정 kit인 API 32 Strep을 이용하여 동정하였다. 이들 결과는 Table 2에 나타내었다. 이상의 결과를 종합 분석한 결과, 자동 kit 및 자동동정기기에 의한 결과가 일치하는 것도 있지만, 상이한 결과를 얻은 것들도 있었다. 우선 API 32 strep에서는 6번과 11번 균주가 확인되지

Table 1. Identification keys of *Enterococcus* species

Species	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. spp</i>
Catalase	–	–	–	–	–
6.5%NaCl	+	+	+	+	+
BEAA	+	+	+	+	+
SF	+	–	–	–	–
Tellulite	+	–	–	–	–
Motility	–	–	+	+	+/-
Arginine	+	+	+	+	+/-
Sorbitol	–	–	–	–	–
Arabinose	–	+	+	+	+
Raffinose	–	–	+	+	+
PYU	+	–	–	–	–
Pigment	–	–	–	+	–
MGP	–	–	+	+	+/-

*PYU, pyruvate; MGP, methyl α -D-glucopyranoside

Table 2. Results from identification kit and autoidentification

	API 32 Strep	Crystal-BBL	Vitek GPI	Microscan
1	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum/casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i>
2	<i>E. spp</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
3	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
4	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
5	<i>E. spp</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum/casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i>
6	UD*	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
7	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. faecium</i>	UD
8	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum/casseliflavus</i>	<i>E. spp</i>
9	<i>E. faecium</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
10	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
11	UD	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
12	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum/casseliflavus</i>	<i>E. spp</i>
13	<i>E. spp</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
14	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
15	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
16	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>
17	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
18	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
19	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
20	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
21	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. gallinarum/casseliflavus</i>	<i>E. spp</i>
22	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>
23	<i>E. durans</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>
24	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>
25	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>	<i>E. spp</i>

*UD; unidentified

않았으며, Vitek GPI card에 의한 결과에서 1, 5, 8번 균주가 *E. gallinarum*으로 나타났으나 다른 검사에서는 *E. faecium*으로 나타났다. 그런데, 전통적인 동정 방법에서는 motility 음성, raffinose 음성, MGP 음성으로 *E. faecium*으로 동정되었다. 자동화기기에서는 *E. faecium*이 다른 균으로 동정되거나 *E. faecium*이 *E. gallinarum*이나 *E. casseliflavus*으로 동정되는 경우가 흔히 있으므로 정확한 동정을 위하여는 자동 동정기기의 사용과 더불어 manual 동정을 병행하는 것이 바람직하다고 하겠다. 이런 잘못된 동정 결과로 VRE 감염 관리 혹은 내성전이 조절에 실수를 범할 수 있다. 자동 동정기기에서 상이한 결과를 보이는 균주에 대하여 manual key 동정 test를 실시하여 최종적으로 이들 균주에 대한 결과를 얻었으며 이를 Table 3에 나타내었다. 그 결과 총 25 균주 중 9개가 *E. faecium*, 11 균주가 *E. faecalis*, 2 균주는 *E. gallinarum*, 1 균주는 *E. durans*, 나머지 2 균주는 *E. spp*로 나타났다. 분리된 25 균주를 검체 별로 분석해 보았더니 urine에서 분리된 균주가 10 균주로 가장 많았고 혈액 배양에서도 높은 분리율을 보였다 (Table 4). 병동 및 외래 분리율은 신경외과 중환자실 9 균주, 내과병동이 7 균주, 중환자실이 5 균주로 나타났다 (Table 5). 비뇨기과 외래 환자로 표기된 환자의 VRE를 조사한 결과 요로 감염으로 1 주간 입원 후 퇴원 시 결과를 보기 위해 내원한 것으로 판명되었으며, 입원 당시 VRE에 감염된 것으로 원내감염으로 추정된다.

2. 항균제 감수성 검사

분리된 25 균주에 대하여 ampicillin, ciprofloxacin, vancomycin,

Table 3. Distribution of the phenotypes and genotypes of 25 isolated strains

No	Strains	Phenotypes	Genotypes
1	<i>E. faecium</i>	VanA	<i>vanA</i>
2	<i>E. faecium</i>	VanA	<i>vanA</i>
3	<i>E. faecium</i>	VanA	<i>vanA</i>
4	<i>E. faecium</i>	VanA	<i>vanA</i>
5	<i>E. faecium</i>	VanA	<i>vanA</i>
6	<i>E. faecium</i>	VanD(resumed)	UD
7	<i>E. faecium</i>	VanA	<i>vanA</i>
8	<i>E. faecium</i>	VanA	<i>vanA</i>
9	<i>E. faecium</i>	VanA	<i>vanA</i>
10	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
11	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
12	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
13	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
14	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
15	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
16	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
17	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
18	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
19	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
20	<i>E. faecalis</i>	VanA	<i>vanA</i>
21	<i>E. gallinarum</i>	VanC	UD*
22	<i>E. gallinarum</i>	VanC	UD
23	<i>E. durans</i>	VanC	UD
24	<i>E. spp</i>	VanA	<i>vanA</i>
25	<i>E. spp</i>	VanA	<i>vanA</i>

*UD; unidentified

Table 4. Specimen distributions of isolated VREs

Site	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. spp</i>	Total
Pus	1	1			2
Urine	3	4	1	2	10
Catheter	1		1		2
Stool	3	2			5
Drain	1				1
CSF		1			1
Blood	2	1			3
Unknown				1	1
Total	11	9	2	3	25

Table 5. Ward and OPD distributions of isolated VREs

Ward and OPD	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. spp</i>	Total
GS	2				2
Med	3		1	3	7
NR	3	4		2	9
I.C.U	4			1	5
RM	1				1
URO *OPD		1			1
Total	13	5	1	6	25

GS, General Surgery; Med, Internal Medicine; NR, Neurosurgery;
I.C.U., Intensive Care Unit; RM, Rehabilitation Medicine; UR, Urology

*OPD : out patient department

tetracyclin의 항균제에 대한 감수성 검사를 disk diffusion 방법에 의해 측정하였다. Vancomycin에 대한 측정 결과는 NCCLS 2002를 참조로 하였으며, 24시간 배양 후 빛에 투과시켜 억제대를 읽었으며, 억제대 내에 조금이라도 성장이 있으면 내성으로 간주하였다. 그 결과 24 균주는 vancomycin에 내성을 나타냈으며 1 균주는 중증도 내성을 나타내었고, tetracyclin에 대한 결과는 1, 2, 5, 6, 7번 균주의 경우 10-28 mm사이로 나타났다. 특이한 것은 6번 균주의 경우 ciprofloxacin과 vancomycin의 수치가 13, 15로 각각 나타나 다른 균주의 6 혹은 8의 수치보다 높게 나타났다 (Table 6).

3. VRE phenotyping

Vancomycin 내성 장구균 (VRE)의 glycopeptide에 대한 내성 phenotype은 vancomycin 및 teicoplanin에 대한 MIC 및 유도능에 따라 VanA, VanB, VanC, VanD, VanE 와 VanG의 여섯 가지로 구분된다. 따라서 동정된 25 균주에 대한 각종 항균제 감수성 및 MIC test의 결과를 Table 6에 표시하였다. Vitek GPS card에 의한 vancomycin의 MIC 값은 모두 32 이상으로 표시가 되며 32 이상의 값에 대한 정확한 값은 판독이 불가능하였다. 따라서, E-test를 통하여 vancomycin과 teicoplanin의 MIC를 측정한 결과 대부분 균주가 vancomycin에 대해 256, teicoplanin에 대해 256의 값을 나타내었다. 특이한 것은 6번 균주의 경우 Vitek GPS card에 의한 MIC 측정에서 0.5 이하로 나타났고, E-test에서 16으로 나타나 다른 균주와 상이한 값을 가지고 있었다. 또한 E-test에 의한 teicoplanin의 수치도 16으로 낮은 값을 나타내어

Table 6. Distributions of sensitivity against antibiotics.

No	Disk diffusion (mm)				MIC (μgml)	E-test	
	Amp	Cip	Van	Tet	Van	Van	Tec
1	6	6	6	10	≥ 32	256	256
2	6	6	6	27	≥ 32	256	256
3	6	6	6	6	≥ 32	256	256
4	6	6	8	6	≥ 32	256	256
5	6	6	6	28	≥ 32	256	256
6	6	13	15	22	≤ 0.5	32	16
7	6	6	6	25	≥ 32	256	256
8	6	6	6	6	≥ 32	256	256
9	6	6	6	6	≥ 32	256	256
10	6	6	6	6	≥ 32	256	256
11	6	6	6	6	≥ 32	256	256
12	6	6	6	6	≥ 32	256	256
13	6	6	6	6	≥ 32	256	256
14	6	6	6	6	≥ 32	256	256
15	6	6	6	6	≥ 32	256	256
16	6	6	6	6	≥ 32	256	256
17	6	6	6	6	≥ 32	256	256
18	6	6	6	6	≥ 32	256	128
19	6	6	6	6	≥ 32	256	256
20	6	6	6	6	≥ 32	192	256
21	6	6	6	6	≥ 32	32	32
22	6	6	6	6	≥ 32	64	32
23	6	6	6	6	≥ 32	64	32
24	6	6	6	6	≥ 32	256	256
25	6	6	6	6	≥ 32	256	256

*Amp; Ampicillin Cip; Ciprofloxacin Van; Vancomycin

Tet; Tetracyclin Tec; Teicoplanin

VanD 형으로 추정된다. 이러한 결과를 토대로 25 균주에 대한 간이 phenotype을 결정하였는데 6번 균주는 VanD 형 추정, 21, 22, 23번은 VanC 형으로 나타났으며 나머지 모두는 VanA 형으로 관찰되었다 (Table 3).

4. PCR을 이용한 VRE 유전자형 형별 분류

9 균주 (*E. faecium*)에 대하여 PCR을 이용한 genotype 판정을 실시하였다. 본 실험에서는 *vanA*와 *vanB* 두 가지 유전자에 대한 primer를 우선 제작하였다. *vanA* 유전자의 sense primer와 antisense primer는 PCR 산물의 크기가 1030 bp가 된다. 반면, *vanB* gene의 sense와 antisense primer는 433 bp의 산물을 얻을 수 있다. 병원이나 임상실험에서 다량의 샘플을 다룰 경우 *vanA*나 *vanB* gene에 대한 PCR 반응을 한 샘플에 대해 두 번의 반응을 하여야 함으로 시간이나 손이 많이 가게 된다. 따라서 이 두 *vanA*와 *vanB* primer에 의한 PCR 산물의 크기가 다르므로, 한꺼번에 두 짝의 primer를 동시에 PCR에 이용함으로써 크기에 의해 genotype을 결정하는 multiplex PCR이 사용되고 있다¹⁹⁾. 본 실험에서 우선 1번 균주에 대하여 genomic DNA kit에 의해 준비된 DNA template를 이용한 multiplex PCR을 실시하였다. 그 결과 Figure 1에 나타난 것처럼 1번 균주에 대한 *vanA* 증폭 산물만이 관찰되었다. 비교 실험을 하기 위하여 *vanA* primer와 *vanB* primer를 각각 따로 넣은 PCR 반응 산물을 같이 전기 영동 한 결과 multiples PCR의 산물에 의한 결과와 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

본격적으로 9 균주에 대한 *vanA* *vanB* genotyping을 위한 PCR을 실시하였다. multiplex PCR 방법은 본 실험에서 사용하지 않고 각각 *vanA*

와 *vanB*에 대한 PCR을 따로 실시하였다. Figure 2에서 보는 것과 같이 우선 *vanA*에 대한 결과를 보면 6번 균주를 제외한 나머지 균주에서 *vanA* PCR 산물이 증폭됨을 알 수 있었다. 따라서 6번 균주를 제외한 나머지 균주는 모두 *vanA* genotype이었다. 지금까지 *vanA* gene이 chromosome 유래 혹은 plasmid 유래 두 종류가 보고되었는데, genomic DNA를 이용한 PCR에서 그 산물이 관찰됨으로 6번을 제외한 나머지 균주는 모두 chromosome 유래의 *vanA* gene을 가지고 있음을 확인하였다. *vanB*에 대한 PCR 결과는 Figure 3에서 보듯이 모든 균주에서 PCR 산물이 관찰되지 않았다

5. *vanA* 유전자의 염기서열 분석

1번 균주에서 증폭된 *vanA* fragment를 subcloning하여 DNA 염기서열을 분석한 결과를 Figure 4에 나타내었다. 예상하였던 바와 같이 1030 bp에 해당하는 *vanA* 유전자 염기서열이 확인되었다

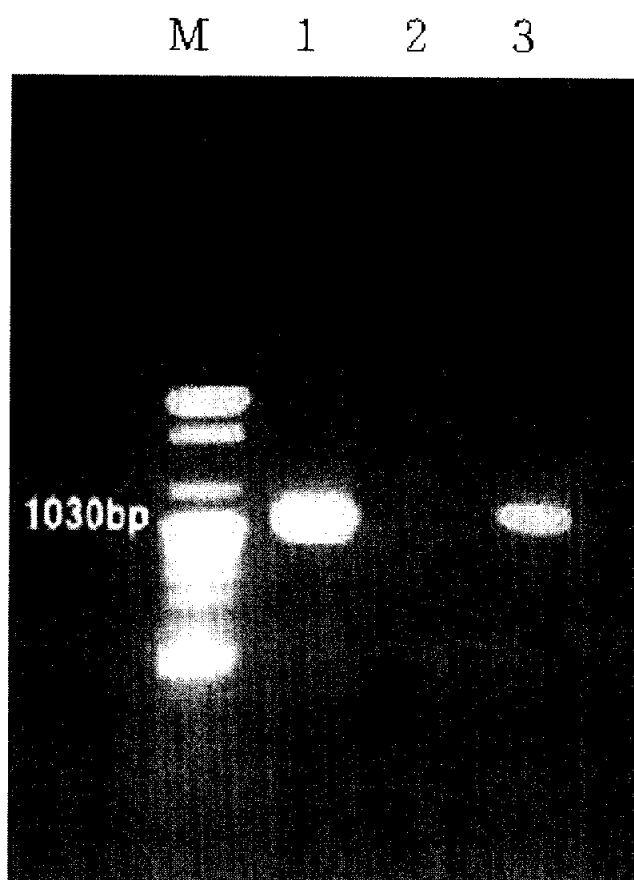


Fig. 1. The PCR patterns of *vanA* and *vanB* using genomic DNA isolated from strain number 1.

M; size marker; 1, *vanA* primers; 2, *vanB* primers;
3, mixture primers for *vanA* and *vanB*

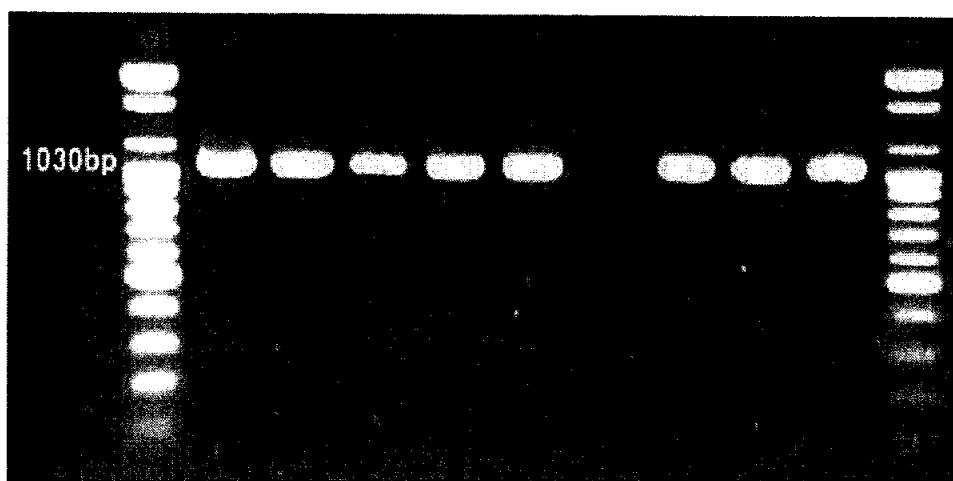


Fig. 2. The PCR patterns from 9 isolated strains using *vanA* primers

M, size marker; 1-9, isolated strains

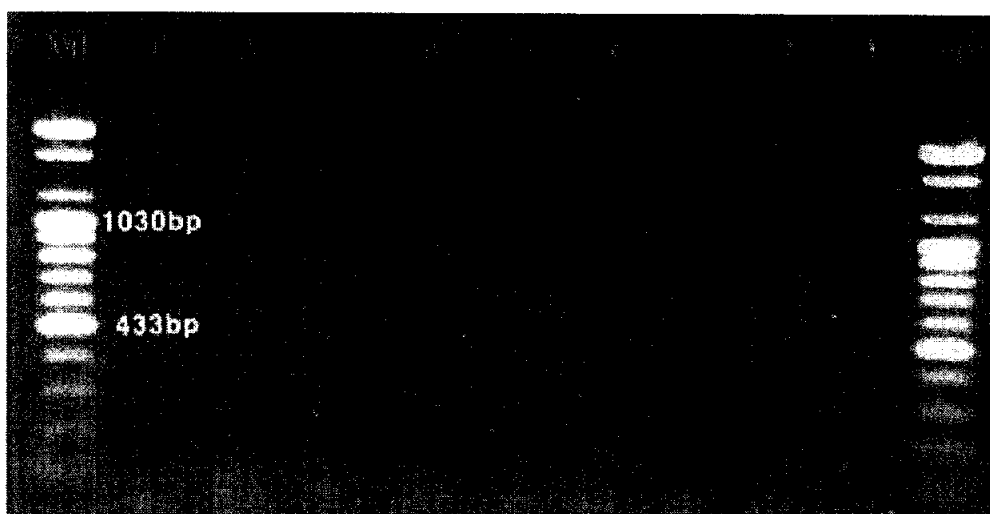


Fig. 3. The PCR patterns from 9 isolated strains using *vanB* primers.

M, size marker; 1-9, isolated strains

1 catgaatagaataaaaagttgcaatactgtttgggggttgctcagaggagcatgacgtatc
 61 ggtaaaatctgcaatagagatagccgctaacattaataaagaaaaatacagagccgttata
 121 cattggaattacgaaatctggtgtatggaaaatgtgcgaaaaaccttgcgcggaatggga
 181 aaacgacaattgctattcagctgtactctcgccggataaaaaaatgcacggattacttgt
 241 taaaaagaaccatgaatatgaaatcaaccatgttgatgtagcattttcagctttgcatgg
 301 caagtcaggatgaagatggatccatacaaggctgtttgaattgtccggtatccctttgt
 361 aggctgcgatattcaaagctcagcaatttgtatggacaaatcgttgacatacatcggtgc
 421 gaaaaatgctgggatagctactcccgcccttttgggttattaataaagatgataggccggt
 481 ggcagctacgtttacctatcctgtttttgttaagccggcgcggttcaggctcatccttcgg
 541 tgtgaaaaaagtcaatagcgcggaacgaattggactacgcaattgaatcggcaagacaata
 601 tgacagcaaaatcttaattgagcaggctgtttcgggctgtgaggtcggttgtgcggtatt
 661 gggaaacagtgccgcgttagttgttggcgaggtggaccaaatacaggctgcagtacggaat
 721 gtttcgtattcatcaggaagtcgagccggaaaaaggctctgaaaacgcagttataaccgt
 781 tccgcagacctttcagcagaggagcgaggacggatacaggaaacggcaaaaaaatata
 841 taaagcgctcggtgttagaggtctagcccggtgtggatatgtttttacaagataacggcog
 901 cattgtactgaacgaagtcaatactctgcccggtttcacgtcatacagtcgttatcccg
 961 tatgatggccgctgcaggtattgcacttccgaactgattgaccgcttgatcgattagc
 1021 gttaaagggg

Fig. 4. The DNA sequence of *vanA* amplified from isolated strain number 1.

IV. 고 찰

본 연구의 실험 재료로 이용된 *Enterococcus*는 통성 혐기성 그람양성 구균으로, 단독, 쌍 또는 짧은 사슬 모양으로 배열되어 있다. 이 균의 생화학적 특성은 catalase에 음성이며, 6.5% NaCl 함유 배지에서 증식하고, 40% bile salt 하에서 esculin을 가수분해한다. cephalosporin, 저농도의 aminoglycoside, clindamycin 등에 자연내성을 나타내며, 분리율도 높고, 흔한 병원감염균의 하나로 인식되고 있다. *E. faecalis*가 가장 많이 분리되고 (80-90%), 다음이 *E. faecium* (5-10%), 나머지 균종은 드물게 분리되고 있다. 최근에는 cephalosporin 사용이 많아져서 쉽게 항균제 내성을 획득하는 *E. faecium*이 증가되고 있는 실정이며, 일으키는 질병은 요로감염이 가장 흔하고 창상감염 등 경한 감염뿐만 아니라 심내막염, 패혈증, 수막염 등 중증 감염도 일으킨다.

Gram positive균에 강한 항균력을 갖는 vancomycin은 β -lactamase와 같이 세균세포벽 peptidoglycan 합성을 방해한다. vancomycin은 세포벽 합성이 일어나는 세포질막 위에 세포질에서 운반되어진 peptidoglycan 전구체의 말단 구조와 결합한다. 이때 세포벽 합성효소는 vancomycin에 의해 입체장애를 위한 기질이 있는 peptidoglycan 말단 구조에 접근이 불가능하게 되어 세포벽 합성반응은 정지한다.

그러나 현재 임상적으로 큰 문제를 일으키고 있는 vancomycin 내성 균주는 vancomycin의 결합 부위에 peptidoglycan 말단 구조가 다른 구조로 변화되어 있다. vancomycin은 이 이종 말단부위에 결합하지 않고 내성을 나타낸다. 따라서 현재 최고로 치료 곤란한 원내 감염균이 되고 있다. Vancomycin 내성 장구균 (VRE)의 glycopeptide에 대한 내성

phenotype은 vancomycin 및 teicoplanin에 대한 MIC 및 유도능에 따라 VanA, VanB, VanC, VanD, VanE와 VanG의 여섯 가지로 구분된다. 이들의 간략한 특징을 살펴보면 다음과 같다.

1) VanA 형: *E. faecium* 및 *E. faecalis*에서 주로 관찰되었으나, 최근에는 다른 균종에서도 이러한 표현형이 관찰됨이 보고되었다. VanA형은 vancomycin의 MIC가 $\geq 64 \mu\text{g/ml}$, teicoplanin MIC가 $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ 로 높고, glycopeptide, moenomycin, bacitracin 등에 의하여 vancomycin, teicoplanin 내성이 유도되며, plasmid에 매개되는 *vanA* 유전자에 의하여 내성이 전달된다. *vanA* 유전자에 의하여 생성되는 VanA 단백질은 D-Ala-D-Ala ligase 활성이 있으며, D-Ala와 D-Lac 사이의 ester 결합을 촉매한다. 이에 의하여 peptidoglycan 전구체 말단의 D-Ala-D-Ala가 D-Ala-D-Lac로 대체되는데, 이 전구체의 glycopeptide 친화성은 1/1,000 이하로 감소되고, 따라서 vancomycin 존재 하에도 세포벽 합성이 진행된다. VanA 표현형은 장구균에서만 관찰되지만, 다른 병원균으로의 확산이 염려된다. *vanA* 유전자가 *S. aureus*로 전달될 수 있음이 실험적으로 증명된 바 있다²¹⁾.

2) VanB 형: *E. faecium* 및 *E. faecalis*에서 주로 관찰된다. VanB 균주는 유도성으로 vancomycin에 내성인데 그 MIC는 $4-1,000 \geq \mu\text{g/ml}$ 로 다양하다. 그러나 teicoplanin은 유도성이 없어서 이들 균주는 이 항균제에 감수성이다. VanB 형 내성은 일부 균주에서 접합에 의하여 전달된다. 내성은 *vanB* 유전자가 포함된 90-250 kb의 큰 유전인자가 염색체에서 염색체로 전이되어 전달된다. *vanB* 유전자에 의하여 생성되는 VanB 단백질은 VanA 단백질과 유사한 작용을 하여 세균이 vancomycin에 내성을 갖게 한다. 그러나 VanB 단백질은 VanA 단백질에 비하여 효소활성이 낮은 것으로 사료된다. 최근에는 *vanB* 유전자를 지니고 있으면서

teicoplanin에 내성인 균주도 있음이 알려졌다. 따라서 표현형만으로는 VanA와 VanB의 구분이 어렵게 되었으며, 이의 감별을 위해서는 분자생물학적 방법에 의한 유전형의 규명이 필요한 것으로 생각된다.

3) VanC 형: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* 및 *E. flavescens* 균주 대부분에서 볼 수 있는 성상으로서, 저농도의 vancomycin (MIC 4-32 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 내성이며, teicoplanin에는 감수성이다. VanC 표현형의 유전자는 염색체에 있고, 구성적으로 발현되는 것으로 생각되었으나, 일부 *E. gallinarum* 균주에서는 유도에 의하여 발현됨이 최근에 보고되었다. *vanC* 유전자도 ligase로 생각되는 효소를 생성한다. *E. gallinarum*의 peptidoglycan 전구체 말단은 D-Ala-D-Ser인데, 이 말단의 vancomycin과의 친화도가 D-Ala-D-Ala보다 낮기 때문에 이 항균제에 내성이 되는 것으로 생각된다.

4) VanD 형: 가장 늦게 발견된 표현형이다. vancomycin의 MIC는 16-64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 비교적 낮고, teicoplanin에는 감수성이다. VanD형 내성은 접합에 의하여 전달이 되지 않으며, 아직은 그 분리 빈도가 극히 낮은 것으로 생각된다.

신형 vancomycin 내성 장구균들도 최근에 보고되고 있다. vancomycin 내성 장구균 (VRE)은 대책이 필요한 VanA 형태 및 VanB 형태, VREs 요소로 되어 있는 VanC 형태로 대별된다. 또, VanD 형, VanE 형태의 VRE도 보고되고 있고 VanG 형태 *E. faecalis*가 남 오스트레일리아에서 분리되었다. 보고에 따르면 vancomycin의 MIC 값은 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었지만 teicoplanin에는 감수성을 보여 주었다. 접합에 의한 vancomycin 내성의 전달은 VanE 형태 VRE와 같이 VanG 형태 VRE이

라도 확인할 수 없었다. Vancomycin 내성에 관계되는 유전자 영역에는 7개의 유전자가 확인되었고 *vanG* 유전자 산물의 아미노산 배열은 *E. faecalis*의 *vanB*, *Bacillus circulans*의 *vanA* 유전자의 아미노산 서열과 각각 47%와 50%의 유사성을 나타내었다. 또한 VanG 형태 VRE도 동시에 4주 분리되었다.

본 연구에 사용된 25 균주를 동정한 결과 VanA형을 가지는 *E. faecium*과 *E. faecalis*가 전체 대부분을 차지하고 있는 것으로 보아, 이미 보고된 바와 같이 *E. faecium*과 *E. faecalis*에 의한 VRE가 대부분인 동일한 결과를 얻었다. 검출 균들에 대한 검체별 (Table 4) 혹은 병동별 (Table 5) 분포를 살펴봄으로써 원내감염의 조절을 위한 자료로서 활용할 수 있다. 검체별 조사에서 urine으로 분리된 검체가 가장 많은 분포를 차지하고 있었다. 병동별 분포를 보면 내과 병동에서 가장 높았으며, 특히 중환자실에서 높은 것으로 보아 VRE에 의한 급격한 질병발생이 많이 나타남을 시사한다. 특이한 것은 6번 균주의 경우 Vitek GPS card에 의한 MIC 측정에서 0.5 이하로 나타났고, E-test에서 16으로 나타나는 다른 균주와 상이한 값을 가지고 있었다. 또한 E-test에 의한 teicoplanin의 수치도 16으로 낮은 값을 나타내어 VanD형으로 추정된다.

VRE에 대한 ribotyping에 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)^{22,23)}, PCR-based method¹⁴⁾, restriction fragment length polymorphism (RFLP)²⁴⁾, random amplified of polymorphic DNA (RAPD)²⁵⁾ 등의 방법이 사용되고 있으나, PCR에 의한 방법이 가장 신속한 genotyping을 가능하게 하는 방법 중의 하나이다. *vanA* gene의 경우 gene이 chromosome에 transposon의 일부로 존재하거나^{23,26-28)} plasmid에 존재하는 두 가지의 경우가 보고되고있다^{1,6,23,29,30)}. 따라서 각 균주에 대하여 boiling method를 통하여 두 가능성을 동시에 PCR하였다¹³⁾. 그러나

보고 된 바에 의하면¹⁷⁾ boiling method를 사용하여 준비된 DNA에서 PCR 반응이 매우 불확실하며, PCR 산물이 증폭되지 않아, 다른 방법에 의한 DNA 분리방법에 비해 PCR하기에는 부적합하였다. 본 실험에서도 1차적으로 boiling method에 따라 DNA template를 준비하였으나, PCR 결과 증폭되는 band를 확인할 수 없었다 (data not shown). 그래서 우선, bacteria의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 하기로 하고 genomic DNA를 추출하는 kit를 통하여 genomic DNA를 준비하였다.

현재 알려진 *van* 유전자들은 A에서 E까지 다양하게 발견되고 있다. 이들 *vanA* 계열 유전자를 specific하게 증폭시키는 specific primer가 유전자형 결정에 사용되어 왔다. 각 사용자마다 조금씩 증폭 부위를 달리 하여 그 PCR 산물의 크기가 달랐다. 본 실험에서는 *vanA* 유전자는 1030 bp, *vanB* 유전자는 433 bp의 PCR 산물이 얻어지도록 각각의 specific primer를 제작하여 사용하였다. 25 균주의 전체 유전자형 조사에 앞서 대부분 *vanA*나 *vanB* 유전자를 가지는 것으로 나타나는 9 균주의 *E. faecium*을 대상으로 유전자형 조사를 실시하였다. 6 번 균주를 제외하고 모두 *vanA* 유전자의 증폭산물인 1030 bp의 band를 전기영동에서 확인할 수 있었다. 이것은 지금까지 *vanA* 유전자가 chromosome 유래 혹은 plasmid 유래 두 종류가 보고되었는데, genomic DNA를 이용한 PCR에서 그 산물이 관찰됨으로 6번을 제외한 나머지 균주는 모두 chromosome 유래의 *vanA* 유전자를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 간혹 *vanA* 유전자와 *vanB* 유전자를 동시에 가지고 있는 균이 보고되고 있어서 이들 9 균주에 대하여 *vanB* 유전자가 PCR에 의하여 증폭되는지 확인하였으나 9 균주 모두에서 증폭되지 않았다. 이 결과는 MIC에 의한 표현형과 일치함을 보여주고 있다. 그런데, *vanA*와 *vanB* 두 가지 모두

에서 증폭이 되지 않은 6번 균주에 대한 견해는 chromosome이 아닌 plasmid 유래의 *vanA* 유전자를 가지고 있거나, *vanA*나 *vanB*가 아닌 다른 유전자를 가지고 있을 가능성이 있다. 이것에 대한 차후 실험은 다른 유전자에 대한 specific primer가 준비되거나, plasmid DNA를 추출하여 *vanA*나 *vanB* primer로 다시 PCR을 실시하여야 할 것이다. 그런데, MIC 결과에서도 6번 균은 다른 나머지 균들과 다른 결과를 나타내고 있다. 나머지 균주에 대한 PCR법에 의한 genotype을 실시하여 그 결과를 앞으로 도출할 것이며, 6번 균주에 대한 세밀한 조사를 할 필요가 있다.

V. 요약

부산 소재 P 대학병원에서 25 명의 환자로부터 VRE로 여겨지는 균주를 선별하여 동정 및 MIC를 실시하였다. 그 결과 9개의 균주가 *E. faecium*, 11 균주가 *E. faecalis*, 2 균주는 *E. gallinarum*, 1 균주는 *E. durans* 나머지 2 균주는 *E. spp*로 각각 동정되었다. 이들 균주를 vancomycin과 teicoplanin에 대한 항균제 감수성 test 및 MIC를 실시하였고, 그 결과 한 균주가 VanD 형으로 추정되며 세 균주는 VanC 형으로 확인되었고 나머지 21 균주는 VanA 형으로 확인되었다. *E. faecium*으로 동정된 9 균주 (VanD형 추정 균주포함)에 대하여 PCR 기법을 이용하여 *vanA vanB* specific primer에 의한 genotyping을 실시하였다. 9 균주의 genomic DNA를 추출하여 PCR template로 사용하였고, PCR을 실시한 결과 VanD 형으로 추정되는 한 균주를 제외한 나머지 8 균주가 *vanA* specific primer에 의해 1030 bp 가량의 PCR 산물을 만들어내었다. 이 결과는 8 균주의 phenotyping한 결과인 VanA형과 일치하는 결과를 얻었다. VanD 형으로 추정되는 균주에서는 *vanA* 및 *vanB* specific primer에 모두 PCR 산물을 만들지 못하였으며, 이는 추가적인 다른 type의 *van* 유전자 specific primer에 의한 실험이 추가로 필요한 것으로 여겨진다.

VI. 참고문헌

1. Woodford, N., P. R. Chadwick, D. Morrison, and B. D. Cookson. 1997. Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their van genotypes during an outbreak. J. Clin. Microbiol., 35:2966-2968.
2. Thal, L., S. Donabedian, B. Robinson-Dunn, J. W. Chow, L. Dembry, D. B. Clewell, D. Alshab, and M. J. Zervos. 1998. Molecular analysis of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates collected from Michigan hospitals over a 6-year period. J. Clin. Microbiol., 36:3303-3308.
2. Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N. Engl. J. Med., 319:157-16
3. Gaynes, R. P. and Edwards JR. 1989-1995. Nosocomial vancomycin resistant *enterococci* (VRE) in the United States: the first isolates [abstract 13]. National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) System. Infect Control Hosp Epidemiol., 17(5 pt 2)(Suppl):18
4. Moellering, R. C., Jr. 1992. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogene. Clin. Infect. Dis., 14:1173-1176.

5. 백경란, 김성민, 이남용, 송재훈. 1996. Vancomycin 내성 장구균의 소화관 집락 양상. 감염 28(3):245-250.
6. Clark, N. C., Cooksey, R. C., Hill, B. C., Swenson, J. M. and Tenover, F. C. 1993. Characterization of glycopeptide-resistant *enterococci* from U.S. hospitals. Antimicrob. Agents Chemother., 37:2311-2317.
7. 박지원, 김양리, 신완식, 강문원, 한경자, 심상인. 1992. Vancomycin 내성 *enterococci*에 대한 감수성 검사. 감염. 24:133-137
8. Patel, R. 2000. Enterococcal-type glycopeptide resistance genes in non-enterococcal organisms. FEMS Microbiol. Lett., 185:1-7.
9. Werner, G., I. Klare, and W. Witte. 1997. Arrangement of the *vanA* gene cluster in *enterococci* of different ecological origin. FEMS Microbiol. Lett., 155:55-61.
10. van Horn, K. G., C. A. Gedris, and K. M. Rodney. 1996. Selective isolation of vancomycin-resistant *enterococci*. J. Clin. Microbiol., 34:924-927.
11. Cheng, S., F. K. McCleskey, M. J. Gress, J. M. Petroziello, R. Liu, H. Namdari, K. Beninga, A. Salmen, and V. G. DelVecchio. 1997. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol.,

35:1248-1250.

12. Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *enterococci* by PCR. J. Clin. Microbiol., 33:24-27.
13. Kanchana, M. V., H. Deneer, and J. Blondeau. 2000. Cost-effective algorithm for detection and identification of vancomycin-resistant *enterococci* in surveillance cultures. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 19:366-369.
14. Kariyama, R., R. Mitsuhashi, J. W. Chow, D. B. Clewell, and H. Kumon. 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant *enterococci*. J. Clin. Microbiol., 38:3092-3095.
15. Klein, G., C. Hallmann, I. A. Casas, J. Abad, J. Louwers, and G. Reuter. 2000. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. J. Appl. Microbiol., 89:815-824.
16. Miele, A., M. Bandera, and B. P. Goldstein. 1995. Use of primers

- selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in *enterococci* and to study gene organization in VanA isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**:1772-1778.
17. Millar, B. C., X. Jiru, J. E. Moore, and J. A. Earle. 2000. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J. Microbiol. Methods.*, **42**:139-147.
18. Moore, J. E., B. C. Millar, X. Yongmin, N. Woodford, S. Vincent, C. E. Goldsmith, R. B. McClurg, M. Crowe, R. Hone, and P. G. Murphy. 2001. A rapid molecular assay for the detection of antibiotic resistance determinants in causal agents of infective endocarditis. *J. Appl. Microbiol.*, **90**:719-726.
19. Petrich, A., K. Luinstra, B. Page, S. Callery, D. Stevens, A. Gafni, D. Groves, M. Chernesky, and J. B. Mahony. 2001. Effect of routine use of a multiplex PCR for detection of vanA- and vanB-mediated enterococcal resistance on accuracy, costs and earlier reporting. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **41**:215-220.
20. Satake, S., N. Clark, D. Rimland, F. S. Nolte, and F. C. Tenover. 1997. Detection of vancomycin-resistant *enterococci* in fecal samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **35**:2325-2330.

21. Noble, W. C., Z. Virani, and R. G. Cree. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett., 72:195-198.

22. del Campo, R., C. Tenorio, M. Zarazaga, R. Gomez-Lus, F. Baquero, and C. Torres. 2001. Detection of a single vanA-containing *Enterococcus faecalis* clone in hospitals in different regions in Spain. J. Antimicrob. Chemother., 48:746-747.

24. Donabedian, S., E. Hershberger, L. A. Thal, J. W. Chow, D. B. Clewell, B. Robinson-Dunn, and M. J. Zervos. 2000. PCR fragment length polymorphism analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol., 38:2885-2888.

25. 홍원표, 김 만, 송정원, 김수현, 신종희, 서순팔, 양동욱. 1998. *Enterococcus faecium*에 대한 plasmid DNA 및 Random Amplified Polymorphic DNA 분석. 대한임상병리학회지. 18:379-385.

26. Handwerger, S. and Skoble, J. 1995. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother., 39:437-442.

27. Jensen, L. B., P. Ahrens, L. Dons, R. N. Jones, A. M. Hammerum, and

- F. M. Aarestrup. 1998. Molecular analysis of Tn1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. J. Clin. Microbiol., 36:437-442.
28. Robredo, B., C. Torres, K. V. Singh, and B. E. Murray. 2000. Molecular analysis of Tn1546 in vanA-containing *Enterococcus* spp isolated from humans and poultry. Antimicrob. Agents Chemother., 44:2588-2589.
29. Mato, R., de Lencastre, H., Robers, R. B. and Tomasz, A. 1996. Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City hospital. Microb. Drug Resist., 2:309-317.
30. Werner, G., I. Klare, and W. Witte. 1999. Large conjugative vanA plasmids in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol., 37:2383-2384.

감사의 글

별 말씀은 없어도 지금까지 배려와 관심으로 지도해주신 송영환 지도 교수님께 진심으로 머리 숙여 감사드립니다.

많은 지도와 가르침을 아끼지 않으셨던 주심 김영태 교수님, 김진상 교수님, 이원재 교수님, 이훈구 교수님께도 진심으로 감사를 드립니다.

이렇듯 어려운 걸 무사히 마칠 수 있도록 많은 것을 배려해 주셨던 손한철 교수님, 김두일 선생님을 비롯한 미생물실 식구들, 임상병리과 선생님 모두에게 정말 감사드립니다.

정화, 논문 완성을 학수고대하는 친구들에게도 이 기쁨을 전합니다.

새로운 길이 어렵고 힘들었지만 뒤늦게 즐거움과 기쁨을 선사해준 또한 할 수 있겠다라는 생각을 갖게 해준 유전자 실험실 박사 과정의 전정민, 이종규 선생님, 학부생인 귀여운 정환이, 든든한 우리 주방장 인영이, 준이, 막내 석균이에게도 고마움을 전합니다.

특히, 이종규 선생님께는 실험 시작부터 끝까지 조용조용하게 마음을 다 써 준 점 정말 감사드립니다.

실험실에서 늦게 들어가도 투정한번 부리지 않고 “엄마 잘해, 엄마 밥 꼭 먹고 해!!!” 하면서 힘을 실어준 든든한 우리 아들 상우, 묵묵히 집안일 돌보아 주시면서 공부하다 몸 상할까봐 되려 걱정해주시는 어머니, 모든 걸 아끼지 않고 믿음과 사랑으로 배려해준 상우 아빠께 이 논문 드립니다.